

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年10月28日 (28.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/092369 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, C12M 1/00,
C12N 5/00, B82B 3/00, G01N 33/483

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005167

(22) 国際出願日: 2004年4月9日 (09.04.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-107267 2003年4月11日 (11.04.2003) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP). オリンパス株式会社 (OLYMPUS CORPORATION) [JP/JP]; 〒1920023 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 宮脇 敦史

(MIYAWAKI, Atsushi) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 今林 浩之 (IMABAYASHI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒1920023 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス株式会社内 Tokyo (JP). 唐木 幸子 (KARAKI, Sachiko) [JP/JP]; 〒1920023 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス株式会社内 Tokyo (JP).

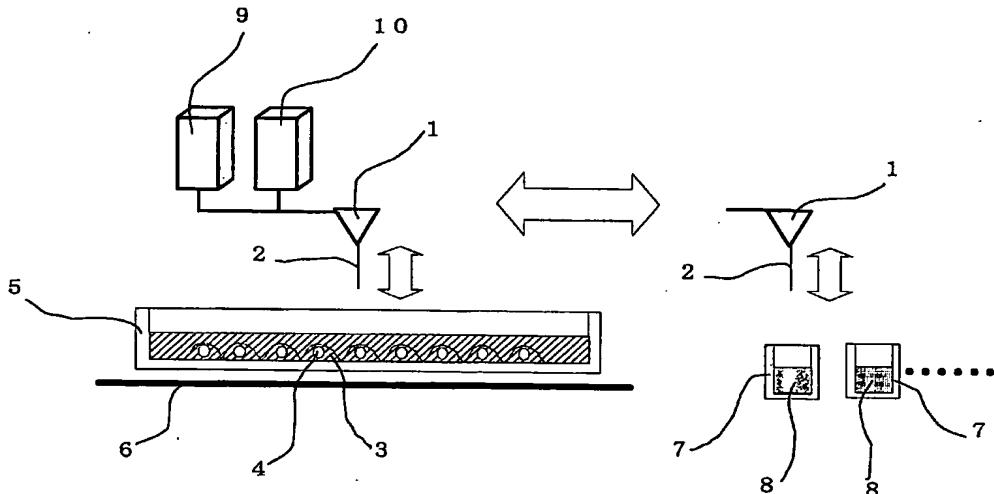
(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF MICROINJECTION AND DEVICE THEREFOR

(54) 発明の名称: マイクロインジェクション方法および装置



WO 2004/092369 A1

(57) Abstract: A method of introducing a physiologically active substance, such as a gene, in cells, wherein at a strikingly lowered degree of attack and invasion to cells, any arbitrary physiologically active substance, such as a gene, can be introduced in any arbitrary cells in microscopic visual field; and a device therefor. In particular, a method of introducing a physiologically active substance in cells, comprising adhering a physiologically active substance around a needle of 50 to 500 nm diameter in an amount incorporated in cell and inserting the needle into the cell. There is further provided a microinjection device for carrying out the method.

(57) 要約: 本発明の目的は、遺伝子などの生理活性物質を細胞内に導入するための方法であって、細胞に与える侵襲度を極端に減らしつつ、顕微鏡視野内の任意の細胞に任意の遺伝子などの生理活性物質を導入するための方法及び装置を提供することである。本発明によれば、細胞内に挿入される範囲で 50 ~ 500 nm の直径を有する針の周囲に生理活性物質を付着させ、該針を細胞内に挿入することを含む、生理活性物質を細胞内に導入する方法、及び上記方法を行うためのマイクロインジェクション装置が提供される。



SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

マイクロインジェクション方法および装置

技術分野

本発明は、細胞内に生理活性物質を導入する方法及びそれに用いるためのマイクロインジェクション装置に関するものである。

背景技術

培養細胞などに遺伝子DNAを導入する技術は、カルシウム沈殿法、Lipid transfer法、ウィルスベクター法、エレクトロポレーション法、遺伝子銃(gene gun)法、マイクロインジェクション法などがある。マイクロインジェクション法以外の方法では、いずれも導入は確率に従い、ある特定の細胞のみを狙って導入することは不可能である。一方、マイクロインジェクション法は、ガラスピペットの先端の直径が $1\text{ }\mu\text{m}$ 前後に及び、これを細胞核にまで刺し入れることによって細胞が容易にダメージを受けやすいという問題がある。また、複数の細胞に別々の遺伝子を導入する場合、その数だけピペットを用意する必要があり、準備などが煩雑であった。

また、特開2003-88383号公報には、生きた細胞からRNAなどの生体分子を採取する手段を提供するために、生体分子と特異的に結合し得る針を微細な位置制御が可能な装置を用いて、生細胞に刺し込み、生細胞から引き抜くことが開示されている。ここで用いる針としては、ZnOウィスカーやカーボンナノチューブを用いている。例えば、金属酸化物ウィスカーの表面はアミノ基が修飾されており、細胞内の生体分子と特異的に結合し、採取できるように施されている。

発明の開示

上記した通り、従来のエレクトロポレーションや遺伝子銃では、一度に大量の

細胞に物質を注入できるが、特定の細胞だけに物質を注入することは困難であった。また、従来のマイクロインジェクションでは、特定の細胞に物質を注入することができるが、注入する針としての中空状のガラスキャピラリを用いていたためその外径を小さくすることには限界があった。そのために細胞に針を注入した際に細胞が破裂したり、致命的な傷害(ダメージ)を受けてしまうという問題や、操作が煩雑であるなどの問題があった。

また、特開2003-88383号公報に示されるように、金属酸化物ウイスカーやカーボンナノチューブに特異的な修飾を施すことにより、生きた細胞から、生体分子を採取することが可能であり、その後の個々の細胞について経時的な変化を連続的に記録することが可能となっている。しかしながら、積極的に遺伝子を導入して経時的な変化を連続的に記録することは開示されておらず、また、上記方法では、生体分子と特異的に結合させる物質を針表面に修飾するための煩雑さなどの問題が存在する。

本発明は上記に示した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。すなわち、本発明は、遺伝子などの生理活性物質を細胞内に導入するための方法であって、細胞に与える侵襲度を極端に減らしつつ、顕微鏡視野内の任意の細胞に任意の遺伝子などの生理活性物質を導入するための方法及び装置を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために検討した結果、細胞内に挿入される範囲で500nm以下の直径を有する針を用いて、該針を細胞内に挿入させることによって上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明によれば、細胞内に挿入される範囲で500nm以下の直径を有する針の周囲に生理活性物質を付着させ、該針を細胞内に挿入することを含む、生理活性物質を細胞内に導入する方法が提供される。

好ましくは、細胞内に挿入される範囲で50～100nmの直径を有する針を使用する。

好ましくは、5μm以下の長さを有する針を使用する。

好ましくは、細胞内に挿入される範囲でテーパー形状を有する針を使用する。

好ましくは、カーボンナノチューブからなる針を使用する。

好ましくは、シリコンからなる針を使用する。

好ましくは、金属酸化物からなる針を使用する。

好ましくは、細胞内に挿入される範囲で50～500nmの直径を有する針が導電性を有している。

好ましくは、生理活性物質はDNA、RNA又はタンパク質である。

好ましくは、生理活性物質の有する電荷と反対の電荷で帯電させた針を使用し、該針に生理活性物質を静電的に付着させた後に、該針を細胞内に挿入する。

好ましくは、生理活性物質の有する電荷と反対の電圧を印加した針を使用し、該針に生理活性物質を電気的に付着させた後に、該針を細胞内に挿入する。

好ましくは、負の電荷を有する生理活性物質を正に帯電させた針に静電的に付着させた後に、該針を細胞内に挿入し、針を負に帯電させて生理活性物質を針から離脱させる。

好ましくは、負の電荷を有する生理活性物質を正の電圧を印加した針に電気的に付着させた後に、該針を細胞内に挿入し、針に負の電圧を印加して生理活性物質を針から離脱させる。

好ましくは、針に負の時間的に変化する電圧を印加させて生理活性物質を針から離脱させる。

好ましくは、時間的に変化する電圧は複数のパルス電圧である。

好ましくは、生理活性物質の有する電荷と反対の電圧が印加される針は、電圧値および印加電圧時間が制御される。

好ましくは、本発明の方法は以下の工程を含む。

- (1) 針を正に帯電させる工程；
- (2) 負に帯電した生理活性物質を含む溶液中に針を浸し、針の周囲に生理活性物質を付着させる工程；
- (3) 細胞内の標的部位に針を挿入し、針に負の電圧を印加して生理活性物質を

針から離脱させる工程；

(4) 針を細胞から抜く工程；及び

(5) 上記工程 (1) ~ (4) を繰り返すことにより、複数の細胞に、細胞毎に所望の同一又は異なる少なくとも 1 種以上の生理活性物質を導入する工程：

本発明の別の側面によれば、細胞内に挿入される範囲で 50 ~ 500 nm の直径を有する針と、細胞内に該針を挿入離脱するために、該針の移動を制御するための駆動手段と、生理活性物質を該針表面から保持離脱するために電圧を印加する電圧印加手段とを有し、該針を細胞内に挿入し、生理活性物質を細胞内に導入することを特徴とするマイクロインジェクション装置が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、細胞内に挿入される範囲で 50 ~ 500 nm の直径を有する針と、細胞内に該針を挿入離脱するために、該針の移動を制御するための駆動手段と、生理活性物質を該針表面から保持離脱するために電圧を印加する電圧印加手段とを有し、該針を細胞内に挿入し、生理活性物質を細胞内に導入することを特徴とする、上記した本発明の方法で使用するためのマイクロインジェクション装置が提供される。

好ましくは、細胞を所定の場所に保持するための細胞保持手段と、細胞保持手段内に保持された細胞を観察するための顕微鏡とを有することを特徴とするマイクロインジェクション装置が提供される。

好ましくは、生理活性物質を収納するための容器を有することを特徴とするマイクロインジェクション装置が提供される。

好ましくは、細胞を観察するための顕微鏡に培養環境維持手段が搭載されている。

好ましくは、該針に連結された該針の移動を制御するための駆動手段は圧電素子である。

好ましくは、該針の移動を制御するための駆動手段により、該針が細胞に対して重力方向から挿入される。

好ましくは、該針の移動を制御するための駆動手段により、該針が細胞保持手

段の細胞保持面に対して所定の高さまで下降する。

好ましくは、該針の表面に付着した生理活性物質を除去するために洗浄槽を有するマイクロインジェクション装置が提供される。

好ましくは、該洗浄槽は、滅菌水洗浄又はアルカリ洗浄又は酸洗浄の少なくとも一つを行う。

好ましくは、該針が細胞内に滞在している時間よりも該針に電圧を印加する時間のほうが短い。

好ましくは、該細胞は生理活性物質が散在した培養液内に含まれている。

本発明のさらに別の側面によれば、生理活性物質が散在した培養液、および細胞を所定の場所に保持するための細胞保持手段と、細胞内に挿入される範囲で50～500 nmの直径を有する針と、該針に連結された該針の移動を制御するための駆動手段と、細胞保持手段内に保持された細胞を観察するための顕微鏡とを有し、細胞へ生理活性物質の導入経路となる穴を該針が形成することを特徴とするマイクロインジェクション装置が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明によるマイクロインジェクション装置を用いてマイクロインジェクションを行うことを含む、生理活性物質を細胞内に導入する方法が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の方法の概要を示す。

図2は、倒立型顕微鏡のステージ上に構成されたマイクロインジェクション装置を示す。

図3は、顕微鏡ステージを上面から見た図（保温箱内部図）を示す。

図4は、マイクロインジェクション装置と、遺伝子導入用の針の位置を示す。

図5は、印加電圧として使用する±5 Vの100 Hzの交番電圧を示す。

図6は、遺伝子DNAを保持してから放出するまでの電圧波形を示す。

図7は、隣り合う細胞の様子を示す。

図 8 は、印加電圧の電圧パターンの一例を示す。

図 9 は、印加電圧の電圧パターンの別の例を示す。

図 10 は、培養液中に細胞内に導入しようとする遺伝子 DNA を散在させた場合の模式図を示す。

図 11 は、直径 50 nm および長さ 3 μm を有するカーボンナノチューブから成る針を示す。

図 12 は、シリコン製のカンチレバーをエッチングにより細径化し、表面に白金層が形成されている針を示す。

上記図中において、1 はカンチレバー、2 は針、3 は細胞、4 は細胞核、5 はシャーレ、6 は細胞保持手段、7 は容器、8 は生理活性物質を含む溶液、9 は駆動手段、10 は電位制御手段、11 はマイクロインジェクション装置、12 は保温箱、13 はヒーター、14 はファン、15 は対物レンズ、16 は標本、17 は透過照明用光源、18 は容器、19 は洗浄槽、20 は XY ステージ、21 は針、22 は積層型圧電アクチュエータ、23 は固定ブロック、24 は Z 軸ステージ、25 はシャーレの底、26 は細胞、27 は細胞核、28 は遺伝子 DNA、そして 29 は針穴を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について、詳細に説明する。

本発明の方法においては、500 nm 以下の直径を有する針の周囲に生理活性物質を付着させ、該針を細胞内に挿入することによって、生理活性物質を細胞内に導入する。

本発明は、遺伝子導入のために非常に細い針（光学的分解能を超えるくらいの針）を使用することを特徴とするが、具体的には、細胞内に挿入される範囲で 500 nm 以下の直径を有する針、特に好ましくは 50 ~ 100 nm の直径を有する針を使用することができる。本発明で使用する針は、その帶電性などの電気的性質をコントロールしやすい針であることが望ましい。本発明では、例えば、針

の表面の電荷をプラスにしてDNA分子を付着させ、針を細胞核に刺入してから、針の表面の電荷をマイナスにすることにより、DNA分子を針の表面から離脱させることができる。本発明では、細い針を使用するために、細胞のダメージを極力小さくすることができ、さらに、任意の狙った細胞に任意のDNAを導入することができる。

また、細胞内小器官（ゴルジ体、ミトコンドリアなど）を針にて損傷させると、細胞の生存率が低下することが知られており、細胞内に挿入される範囲で50～500nmの針を用いることにより、細胞核大きさに対して十分に小さく、細胞核以外の細胞内小器官を傷つけにくい。さらに、針を真上（重力方向）から細胞に進入させることにより、細胞核と細胞膜が最も接近した箇所に針を挿入することになる。ここで、細胞核と細胞膜の微小な空間領域に細胞内小器官が存在する確率が下がっており、この点からも、細胞内小器官を傷つける事が少なく、細胞の生存率を向上できる。

なお、導電性（帶電性）を有する表面の針を用いることだけですみ、特に、生体分子に合わせた修飾を針表面に施すことは必要としない。

例えば、100種類のDNA溶液と100個の細胞を用意し、針をDNA溶液に浸し、細胞の真上から細胞に針を突き刺す。このように針をDNA溶液に浸す操作と、針を細胞に突き刺す操作を繰り返すことによって、異なる細胞にそれぞれ所望のDNAを導入して別々に形質転換することができる。従って、本発明の方法によれば、薬剤スクリーニングや生体分子間相互作用の網羅的解析を、従来のように、96穴プレートや384穴プレート等を用いてウエル毎に行うのではなく、1細胞レベルで行うことが可能になる。

本発明で用いる針の材料は、上記した性質を有するものであれば特に限定されないが、例えばカーボンナノチューブなどが挙げられる。カーボンナノチューブはグラファイトの一層（グラフィン）を丸めた円筒形の形状を有し、100%炭素原子から構成される微小な結晶である。近年、ナノテクノロジーが脚光を浴び、このカーボンナノチューブも多方面から注目されている。カーボンナノチューブ

を使用する研究例には、液晶、プラズマディスプレイに代わり、ナノチューブを電子銃に使用する画面の開発、燃料電池及び太陽電池への応用、または水素貯蔵材料などが挙げられる。これらは、カーボンナノチューブ自体が有する微小さ、その立体構造から得られる量子物性、ならびに純水に炭素からのみなるという各種の特徴の組み合わせから、従来とは異なるユニークな性質を有するためである。カーボンナノチューブはまた、純水に炭素のみからなり、カーボンブラック等と異なり不純物をほとんど含有しない。また、成形時および／または使用時に高温下に曝されても、変化しないという特徴も有する。

現在、Multi wall カーボンナノチューブとしては、直径が 50～100 nm 程度で、長さが 3 μm 以上のものが入手可能であり、本発明ではこのようなカーボンナノチューブを使用することが好ましい。針の直径が細すぎると保持できる生理活性物質の量が少なくなり、反対に針の直径が太すぎると細胞への侵襲が大きくなり、いずれも好ましくない。従って、本発明では、細胞内に挿入される範囲で 500 nm 以下の直径を有する針を使用し、さらに好ましくは 50～100 nm の直径を有する針を使用する。また、針の長さについては、通常の培養細胞の高さが 5 μm 程度であるので、5 μm 以下の長さの針を使用すれば十分であり、例えば、3 μm 程度の針も使用することができる。

このほかに使用できる針としては、以下のものがある。

従来例に示されているような金属酸化物ウイスカーに金 (Au) 又は白金 (Pt) 等を蒸着・スパッタなどの装置を用いて表面が導電性を有するようにした針。また、原子間力顕微鏡のカンチレバーとして多用されているシリコン製カンチレバーに金 (Au) 又は白金 (Pt) 等を蒸着・スパッタなどの装置を用いて表面が導電性を有するようにした針なども使用できる。なお、シリコン製カンチレバーは針先部を IPC や FIB などの装置を用いてエッチングし、先鋒化した後に、導電膜を形成することにより、生細胞への侵襲度はさらに、低減することができる。また、シリコン製のカンチレバーの場合、エッチングにより針先にテーパー形状を有することにより、針強度を向上することができる。なお、前記の針は、

細胞内に挿入される範囲で 50～500 nm の直径を有する針であることが、細胞へのダメージを低減する上で必要であり、前述のテーパー形状を有する場合の針の場合も、細胞内に挿入される範囲で 50～500 nm の直径を有する形状となっている。

本発明の方法で細胞に導入することができる生理活性物質の種類は特に限定されないが、一般に DNA または RNA などの核酸、およびタンパク質などが挙げられ、好ましくは核酸である。核酸は DNA でも RNA でもよく、また、DNA は、ゲノム DNA またはその断片、cDNA、または合成オリゴヌクレオチド等の合成 DNA のいずれでもよい。

本発明では、上記したような細胞内に挿入される範囲で 50～500 nm の直径を有する針（カーボンナノプローブや導電表面を有する金属酸化物などのウィスカ）を、原子間力顕微鏡（AFM）のカンチレバーの先に装着し、電気的接続を行うことができる。ここで言う電気的接続とは、針の電荷を正または負に制御するための電気的接続のことを言う。このカンチレバーは顕微鏡の画像処理と連動させて、目的の生理活性物質を入れてある容器と、目的の細胞（細胞核など）との間で移動させることにより、目的の生理活性物質を目的の細胞のみに導入することができる。本発明の好ましい態様では、針は常に垂直方向を向き、高い精度で針先位置をコントロールすることができる。

上記した針の移動は、針の移動を制御するための駆動手段により行うことができる。すなわち、細胞内に挿入される範囲で 50～500 nm の直径を有する針、および該針の移動を制御するための駆動手段を有するマイクロインジェクション装置が提供される。さらに、具体的には、本発明のマイクロインジェクション装置は、(a) 細胞を所定の場所に保持するための細胞保持手段；(b) 細胞内に挿入される範囲で 50～500 nm の直径を有する針、および該針に連結された該針の移動を制御するための駆動手段；および(c) 細胞保持手段内に保持された細胞を観察するための顕微鏡から構成することができる。

本発明では、生理活性物質の有する電荷と反対の電荷で帶電させた針を使用し、

該針に生理活性物質を静電的（電気的）に付着させた後に、該針を細胞内に挿入することができる。DNAなどの負の電荷を有する生理活性物質を細胞に導入する場合には、正に帯電させた針に上記生理活性物質を静電的（電気的）に付着させた後に、該針を細胞内に挿入すればよい。

なお、本発明においては、生理活性物質の電気的な極性を利用して、任意の時間に針表面に生理活性物質を保持したり、離脱させたりできるものである。つまり、静電的に保持できること以外にも、針への電圧印加を維持した状態でも生理活性物質が針表面に付着することは言うまでもなく、印加電圧の極性を逆転（反転）させることにより離脱させることが可能である。

以上から、必ずしも静電的な作用に限定されるものではなく、生理活性物質の電気的特性に応じて、又は、使用目的に応じて、針への印加電圧方法を選択することにより、様々な用途に適用することができる。

本発明の方法の一例としては、以下の工程を行うことができる。

- (1) 針を正に帯電させる工程；
- (2) 負に帯電した生理活性物質を含む溶液中に針を浸し、針の周囲に生理活性物質を付着させる工程；
- (3) 細胞内の標的部位に針を挿入して細胞内に生理活性物質を導入する工程；
- (4) 針を細胞から抜き、針を負に帯電させて針の周囲に残存した生理活性物質を除去する工程；および
- (5) 上記(1)～(4)を繰り返すことにより、複数の細胞に、細胞毎に所望の同一または異なる少なくとも1種類以上の生理活性物質を導入する工程：

以下に、本発明の実施の態様の一例を図を参照して説明する。

図1に本発明の方法の概要を示す。図1は駆動手段9に接続されたカンチレバー1に装着された針2が、細胞3の真上の位置と、生理活性物質を含む溶液8を含む容器7の真上の位置との間を移動することを両方向の矢印を用いて示す。細胞3はシャーレ5の内部で培養されており、シャーレ5は細胞保持手段6の上に設置されている。

先ず初めに、針2を、生理活性物質を含む溶液8を含む容器7の中に挿入して、針2の表面に生理活性物質を含む溶液を付着させる。この溶液の針への付着は、針2に電気的に接続されている電位制御手段10によって針の電荷を制御することにより行うことができる。すなわち、生理活性物質が核酸などの負の電荷を有する物質である場合は、電位制御手段10によって針2を正に帯電させておくことにより、生理活性物質を効率的に針2に付着させることができる。

続いて、生理活性物質を付着させた針2を上昇させて、生理活性物質を含む溶液8を含む容器7から引き出し、横方向に移動して目的の細胞3の真上の位置に移動する。細胞3の真上の位置にある針2は、下に移動して目的の細胞3の細胞核4の中へと挿入される。細胞核4の中に挿入された針は、その状態で表面に付着している生理活性物質を細胞核4の内部に放出する。生理活性物質の放出は針2に電気的に接続されている電位制御手段10によって針の電荷を制御することにより行うことができる。すなわち、生理活性物質が核酸などの負の電荷を有する物質である場合は、電位制御手段10によって針2を負に帯電させることにより、生理活性物質を効率的に針2から放出させることができる。生理活性物質を細胞核4の内部に放出した後、針は細胞から引き上げられる。以後、上記の操作を繰り返すことにより、所望の生理活性物質を所望の細胞核に導入することができる。上記に示した針2の移動は全て駆動手段9により制御されている。

本発明はさらに、細胞内に挿入される範囲で50～500nmの直径を有する針と、細胞内に該針を挿入離脱するために、該針の移動を制御するための駆動手段と、生理活性物質を該針表面から保持離脱するために電圧を印加する電圧印加手段とを有し、該針を細胞内に挿入し、生理活性物質を細胞内に導入することを特徴とするマイクロインジェクション装置に関する。

以下に、マイクロインジェクション装置について、詳細を説明する。

図2に示されるようにマイクロインジェクション装置は倒立型顕微鏡のステージ上に構成されており、遺伝子導入開始からその後の経過を観察・計測できるものである。顕微鏡ステージ上には温度環境を37℃に維持するための保温箱12

が構成され、その内部に、マイクロインジェクション装置が設置される。

図3は顕微鏡ステージを上面から見た図（保温箱内部図）である。保温箱は内部に熱伝導性に優れた金属（アルミニウム合金など）で構成され、内部の側面にヒーター13や内部空気攪拌用のファン14が設置されている。保温箱外表面は断熱材にて覆われ、外部環境に熱が逃げないようになっている。また、倒立型顕微鏡にて内部を観察するために、保温箱の上下には、一部の領域がガラス面となり、対物レンズ15にて標本16（シャーレ内の細胞など）を観察できる。さらに、透過照明用の光源からの光が標本に照射でき、位相差観察や微分干渉観察が実施できるようになっている。

そして、細胞の培養液のペーハー（PH）を培養環境に最適化するために、保温箱外部より配管を通して5%CO₂が供給され、ファンにより、保温箱内部は均一に5%濃度のCO₂雰囲気となっている。

保温箱の内部に形成された顕微鏡ステージ上には、標本となるシャーレ（ディッシュやマイクロプレート等）や、遺伝子DNAを含む溶液の入ったサンプルカップなどの容器18や、針を洗浄する洗浄槽19などがモータなどで動作するXYステージ20上に構成されている。

よつて、遺伝子導入用の針の下には、標本16、容器18、洗浄槽19が移動してくることができ、同様に、標本内の全エリアを観察することができる。

遺伝子導入用の針21はZ方向（重力方向）にのみ移動し、針下に位置される対象に向かって、上下動される。図4に示されるように、遺伝子導入用の針21は薄板の圧電素子（チタン酸ジルコン酸鉛）を積層した積層型圧電アクチュエータ22の端面に針先を下に向けて設置されている。もう一方の積層型圧電アクチュエータ22の端面は固定ブロック23に設置され、積層型圧電アクチュエータ22に電圧を印加すると下方向に針21が微小移動するようになっている。市販されている積層型圧電アクチュエータにもよるが、100V程度で10μmの移動量が実現でき、印加電圧値により、その変位量を制御することができる。

さらに、固定ブロック23はZ軸ステージ24に搭載され、針21のZ方向位

置は、Z 軸ステージ 2 4 により粗動作、積層型圧電アクチュエータ 2 2 により微動作の 2 段駆動機構により、細胞 2 6 へ針 2 1 を進入させる。例えば、標本 1 6 となるシャーレの上方に位置し、シャーレ内の細胞 2 6 付近までは粗動作し、その後、針 2 1 を細胞 2 6 に進入させる際には、微動作させる。針 2 1 は非常に折れやすいため、針先が標本 1 6 のシャーレなどの底に接触する直前（例えば、底から $1 \mu m$ の高さ）で動作を停止する。

つまり、針 2 1 は細胞核 2 7 を貫通してもよく、常に、底から $1 \mu m$ の高さに針先を下降することだけを装置に認識させることにより、容易に自動化できる。特に、細胞膜表面を検出し、その位置から数 μm 下降するなどの制御動作は無用であり、高額な検出部品などを削減できる。

一方、遺伝子 DNA 溶液が入った容器 1 8 や洗浄槽 1 9 に下降する場合は、厳密な高さ制御は不要であるため Z 軸ステージ 2 4 による粗動作だけでよい。

動作については、前述した通りであるが、以下の工程による。

(1) 針の洗浄：遺伝子導入用の針 2 1 の下に洗浄槽 1 9 が位置し、洗浄槽 1 9 内に針 2 1 が下降する。洗浄槽 1 9 内には、洗浄水（滅菌水）などが貯留されており、針 2 1 が確実に浸漬された状態で、針 2 1 に交番電圧が印加される。針先に付着したゴミや前回付着させた遺伝子 DNA を除去する。例えば、図 5 のように、印加電圧としては $\pm 5 V$ の $100 Hz$ の交番電圧を印加する。これにより、針表面の不純物が除去される。好ましくは、洗浄槽 1 9 を超音波洗浄化したり、酸又はアルカリなどの薬品洗浄槽と滅菌水洗浄槽を 2 つ設けてもよい。

(2) その後、洗浄槽 1 9 から針 2 1 は上昇し、その過程で、針先をエアープローラーなどにより、乾燥させてもよい。

(3) 次に、針下に遺伝子 DNA 溶液が入った容器 1 8 が移動され、その中に針 2 1 が下降する。溶液に浸漬された状態で、針表面に正の電圧を印加する。例えば、印加電圧を $1 V$ 、印加時間を 3 秒間以上とする。これにより、遺伝子 DNA が負の極性を有しているため、針表面に付着する。その後、針先は上昇し、標本 1 6 が針下に位置される。この間、針先に電圧を印加していても、しなくてもよい。

(4) 針先が標本 1 6 のシャーレ内に下降する際には、針 2 1 への印加電圧を停止し、細胞表面付近まで粗動作で下降し、その後、微動作で細胞核 2 7 に針 2 1 を下降させる。

(5) 針 2 1 の移動が停止した後、針先へ負の電圧を印加し、針表面の遺伝子 DNA を離脱させ、細胞内（細胞核内）に放出する。例えば、印加電圧は -0.5 V、印加時間は 1 秒程度である（針の遺伝子 DNA が離脱するために十分な時間の電圧を印加することが望ましい）。遺伝子 DNA を保持してから放出するまでの電圧波形を示すと、図 6 のようになる。

(6) 電圧印加終了後、針 2 1 を上方に移動させ、洗浄槽 1 9 にて針 2 1 を洗浄し、異なる遺伝子 DNA が入った容器にて別の遺伝子 DNA を針表面に保持し、別の細胞に放出する。

このように、針表面に保持された遺伝子 DNA を細胞内で放出する場合、細胞内に針 2 1 が滞在している間だけ、負の電圧を印加し、電気的な反発により、遺伝子 DNA を離脱できるようにした。培養液中で電圧を印加する場合には、電気化学反応により、泡の形成が懸念されるために、必要な時間のみ、培養液中では電圧を印加するところが望ましい。よって、細胞内に針が滞在している間のみ電圧を印加し、細胞に刺すまでの移動時間および、細胞から針が退避するまでの移動時間中は電圧の印加を停止することがよい。

これらの動作を繰り返すことにより、図 7 に示されるように隣り合う細胞 2 6 に異なる遺伝子 DNA を導入することが可能となり、細胞間の相互作用の解析などに利用することができる。また、既存のガラス管を用いたマイクロインジェクション装置では、遺伝子 DNA の溶液を油圧機構により吸引・排出したり、針先を細胞に位置合わせすることを手動動作で利用者が実施しており、熟練度が必要となっていた。しかしながら、本発明の構成では、細胞の画像処理を利用して細胞核 2 7 を認識し、その細胞核 2 7 の中心に針先を位置指定し、その後は、自動化することが容易であり、熟練度は皆無となる。

なお、上記の実施の態様では、異なる遺伝子 DNA をそれぞれの細胞に導入する

工程を述べたが、針21が非常に細く細胞へのダメージが少ないため、異なる遺伝子DNAを一つの細胞に複数導入することも可能である。

なお、針先への印加電圧は上述に限られるものではなく、例えば、図8や図9に示される電圧パターンでもよい。図8においては、遺伝子DNAを保持する時間を短縮し、針先への遺伝子DNAの付着量を少なくすることができる。つまり、導入される遺伝子DNAの量は、このときに付着される量に左右されるため、電圧値を小さく、印加時間を短くすると、付着量は少なくなり、逆を行えば、付着量を多くすることができ、導入量も増加する。細胞への遺伝子導入量に変化(差)を設ける場合の手段として、有効である。また、図9は細胞核内に遺伝子DNAを放出する際に、針先への印加電圧を短い間隔でパルス電圧化(時間的に変化する電圧化)することにより、針先に付着した遺伝子DNAの剥離作用現象を助長し、ほぼ全量の離脱を行うことができる。細胞内での電圧印加は全く影響がないとは言えず、刺激となりうる。このため、印加時間は少ないほど好ましく、例えば、印加電圧を-1V、10Hzにて10パルスの電圧を印加する。

さらに、針を微動作させる積層型圧電アクチュエータ22はほぼ、電圧の印加に応じて高速に変位することが可能である。例えば、断面積5mm角長さ20mmの積層型圧電アクチュエータ22の屈曲方向固有振動数は数kHzに存在し、その周波数以下(共振領域以下)では電圧パターンに呼応して、針先が追従して動作する。このことから、細胞26への針21進入を数Hzの高速で進入させ、その周期で針21を上昇する。そして、その僅かな挿入から退避までの時間中に、前述の複数のパルス電圧を印加すれば、細胞26に留まる針21の時間も短縮でき、より細胞26への侵襲度を低減することができる。

また、図10に示されるように、培養液中に細胞内に導入しようとする遺伝子DNAを散在させた場合について説明する。遺伝子導入用の針21を積層型圧電アクチュエータ22により高速(数kHzの1サイクル動作周期)に上下往復動作させて、細胞膜(細胞核27)に針穴29を形成する。前述のように針21は微小径であり、その挿入による細胞26への影響は小さく、また、針21を高速に抜

き差しするために、さらに、細胞 26へのダメージを低減することができる。これにより、細胞 26内（細胞核 27内に）に溶液中の遺伝子DNAの導入経路が確保され、この状態で培養することにより、溶液中の遺伝子DNAを導入することができる。よって、個々の細胞 26に 1箇所以上の針穴を自動動作で形成することにより、複数の細胞に容易に遺伝子DNAを簡便に導入できる。

好ましくは、遺伝子DNA 28が散在している培養液中で針に正の電圧を印加し、針表面に遺伝子DNAを保持し、細胞内に挿入された時間帯に、負のパルス電圧を複数印加し、細胞内に遺伝子DNAを放出する。これらの動作を培養液内で針がXY面内を動作し、次々と別の細胞に遺伝子DNAを導入していく。遺伝子DNAを針表面に保持するために容器に浸漬する動作や、洗浄動作等が省略できるために、短時間に多数の細胞に対して導入でき、その導入効率も高かめられる。

このように遺伝子導入された細胞はその後、顕微鏡に搭載された保温箱内で培養を継続し、遺伝子が発現するまでの過程や、細胞間の相互作用を経時的に観察・計測することが可能となる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

実施例 1

培養シャーレ内で培養している神経細胞に対して、図 1に記載の装置を用いてDNAを導入した。

神経細胞としてはPC12細胞（ラット副腎髓質クロム親和性細胞種より単離された神経系クローン細胞）を用いた。培地は、10%胎児ウシ血清（FBS）を含むDMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium）を用いた。培養は37°C、5%CO₂の条件下で行った。DNAとしは、NGF受容体遺伝子を含む組み換え発現ベクターを使用し、1 μg/mlのDNA溶液を使用した。

図 1に記載の装置で使用した針は、図 1-1に示される直径 50 nm および長さ

3 μ mを有するカーボンナノチューブから成る針である。

先ず、針をDNA溶液に浸し、その表面にDNAを付着させた後、神経細胞の核の内部に針を挿入して、DNAを放出させた。DNAを導入後、神経細胞を引き続き培養したが、3日経過後においても神経細胞は生存していた。

なお、図12に示される針はシリコン製のカンチレバーをエッティングにより細径化し、表面に白金層が形成されている。こちらの針を用いて、HeLa細胞への導入を実施した結果、同様に、DNAを導入後、3日経過後においてもHeLa細胞は生存していた。

一方、比較例として、直径50nmおよび長さ3 μ mを有するカーボンナノチューブから成る針を使用する代わりに、上記と同じDNA溶液を充填したガラスピペット（内径300 μ m）を用いて、マイクロインジェクションを行った。マイクロインジェクション後、神経細胞を培養したが、3日後までに神経細胞死んでしまい、生存している細胞は皆無であった。

産業上の利用の可能性

本発明により、細胞に与える侵襲度を極端に減らしつつ、顕微鏡視野内の任意の細胞に任意の遺伝子などの生理活性物質を導入するための方法及び装置を提供することが可能になった。

請求の範囲

1. 細胞内に挿入される範囲で 500 nm 以下の直径を有する針の周囲に生理活性物質を付着させ、該針を細胞内に挿入することを含む、生理活性物質を細胞内に導入する方法。
2. 細胞内に挿入される範囲で 50 ~ 100 nm の直径を有する針を使用する、請求項 1 に記載の方法。
3. 5 μm 以下の長さを有する針を使用する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。
4. 細胞内に挿入される範囲で テーパー形状を有する針を使用する、請求項 1 から 3 に記載の方法。
5. カーボンナノチュープからなる針を使用する、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法。
6. シリコンからなる針を使用する、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法。
7. 金属酸化物からなる針を使用する、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法。
8. 細胞内に挿入される範囲で 50 ~ 500 nm の直径を有する針が導電性を有している、請求項 1 から 7 の何れかに記載の方法。
9. 生理活性物質が DNA、RNA 又はタンパク質である、請求項 1 から 8 の何れかに記載の方法。
10. 生理活性物質の有する電荷と反対の電荷で帶電させた針を使用し、該針に生理活性物質を静電的に付着させた後に、該針を細胞内に挿入する、請求項 1 から 9 の何れかに記載の方法。
11. 生理活性物質の有する電荷と反対の電圧を印加した針を使用し、該針に生理活性物質を電気的に付着させた後に、該針を細胞内に挿入する、請求項 1 から 9 の何れかに記載の方法。
12. 負の電荷を有する生理活性物質を正に帶電させた針に静電的に付着させた後に、該針を細胞内に挿入し、針を負に帶電させて生理活性物質を針から離

脱させる、請求項 10 又は 11 に記載の方法。

13. 負の電荷を有する生理活性物質を正の電圧を印加した針に電気的に付着させた後に、該針を細胞内に挿入し、針に負の電圧を印加して生理活性物質を針から離脱させる、請求項 10 又は 11 に記載の方法。

14. 針に負の時間的に変化する電圧を印加させて生理活性物質を針から離脱させる、請求項 10 から 13 の何れかに記載の方法。

15. 時間的に変化する電圧が複数のパルス電圧である、請求項 14 に記載の方法。

16. 生理活性物質の有する電荷と反対の電圧が印加される針が、電圧値および印加電圧時間が制御される、請求項 11 又は 13 に記載の方法。

17. 以下の工程を含む、請求項 1 から 16 の何れかに記載の方法。

- (1) 針を正に帶電させる工程；
- (2) 負に帶電した生理活性物質を含む溶液中に針を浸し、針の周囲に生理活性物質を付着させる工程；
- (3) 細胞内の標的部位に針を挿入し、針に負の電圧を印加して生理活性物質を針から離脱させる工程；
- (4) 針を細胞から抜く工程；及び
- (5) 上記工程 (1) ~ (4) を繰り返すことにより、複数の細胞に、細胞毎に所望の同一又は異なる少なくとも 1 種以上の生理活性物質を導入する工程：

18. 細胞内に挿入される範囲で 50 ~ 500 nm の直径を有する針と、細胞内に該針を挿入離脱するために、該針の移動を制御するための駆動手段と、生理活性物質を該針表面から保持離脱するために電圧を印加する電圧印加手段とを有し、該針を細胞内に挿入し、生理活性物質を細胞内に導入することを特徴とするマイクロインジェクション装置。

19. 細胞内に挿入される範囲で 50 ~ 500 nm の直径を有する針と、細胞内に該針を挿入離脱するために、該針の移動を制御するための駆動手段と、生理活性物質を該針表面から保持離脱するために電圧を印加する電圧印加手段とを

有し、該針を細胞内に挿入し、生理活性物質を細胞内に導入することを特徴とする請求項 1 から 17 の何れかに記載の方法で使用するためのマイクロインジェクション装置。

20. 細胞を所定の場所に保持するための細胞保持手段と、細胞保持手段内に保持された細胞を観察するための顕微鏡と、を有することを特徴とする請求項 18 又は 19 に記載のマイクロインジェクション装置。

21. 生理活性物質を収納するための容器を有することを特徴とする請求項 18 から 20 の何れかに記載のマイクロインジェクション装置。

22. 細胞を観察するための顕微鏡に培養環境維持手段が搭載されている、請求項 20 に記載のマイクロインジェクション装置。

23. 該針に連結された該針の移動を制御するための駆動手段が圧電素子である、請求項 18 又は 19 に記載のマイクロインジェクション装置。

24. 該針の移動を制御するための駆動手段により、該針が細胞に対して重力方向から挿入されることを特徴とする請求項 18 又は 19 に記載のマイクロインジェクション装置。

25. 該針の移動を制御するための駆動手段により、該針が細胞保持手段の細胞保持面に対して所定の高さまで下降することを特徴とする請求項 18 又は 19 に記載のマイクロインジェクション装置。

26. 該針の表面に付着した生理活性物質を除去するために洗浄槽を有することを特徴とする請求項 18 又は 19 に記載のマイクロインジェクション装置。

27. 該洗浄槽が、滅菌水洗浄又はアルカリ洗浄又は酸洗浄の少なくとも一つを行うことを特徴とする請求項 26 に記載のマイクロインジェクション装置。

28. 該針が細胞内に滞在している時間よりも該針に電圧を印加する時間のほうが短いことを特徴とする請求項 18 又は 19 に記載のマイクロインジェクション装置。

29. 該細胞が、生理活性物質が散在した培養液内に含まれていることを特徴とする請求項 18 又は 19 に記載のマイクロインジェクション装置。

30. 生理活性物質が散在した培養液、および細胞を所定の場所に保持するための細胞保持手段と、細胞内に挿入される範囲で50～500nmの直径を有する針と、該針に連結された該針の移動を制御するための駆動手段と、細胞保持手段内に保持された細胞を観察するための顕微鏡とを有し、細胞へ生理活性物質の導入経路となる穴を該針が形成することを特徴とするマイクロインジェクション装置。

31. 請求項18から30の何れかに記載のマイクロインジェクション装置を用いてマイクロインジェクションを行うことを含む、生理活性物質を細胞内に導入する方法。

図 1

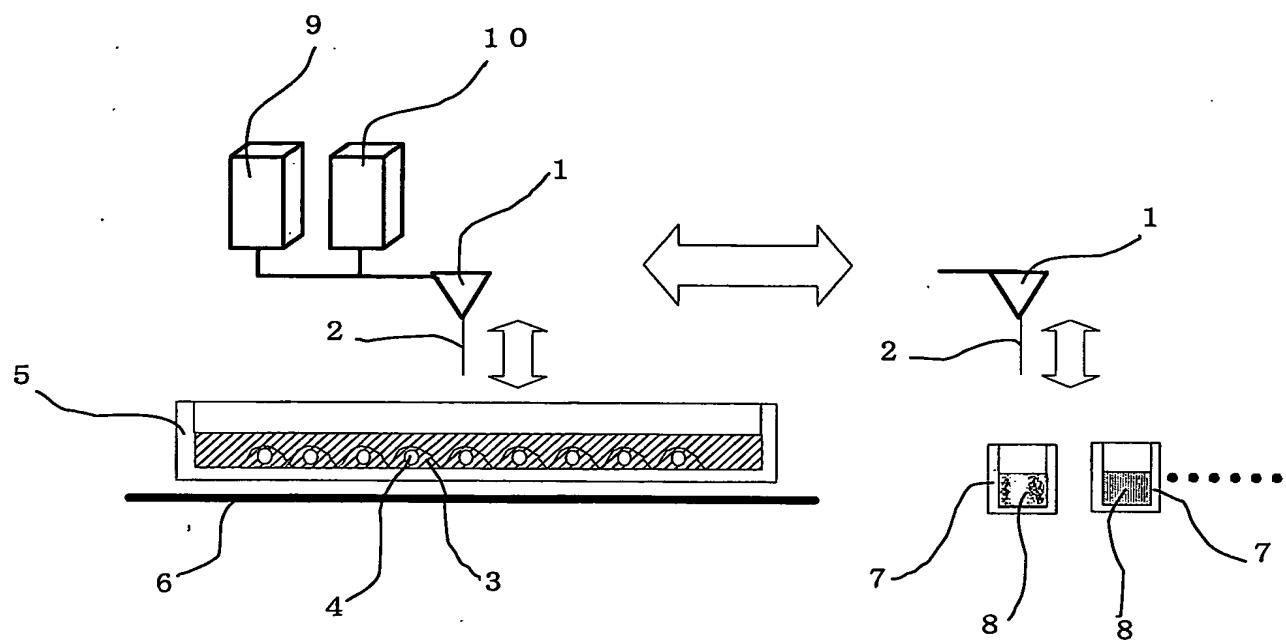


図 2

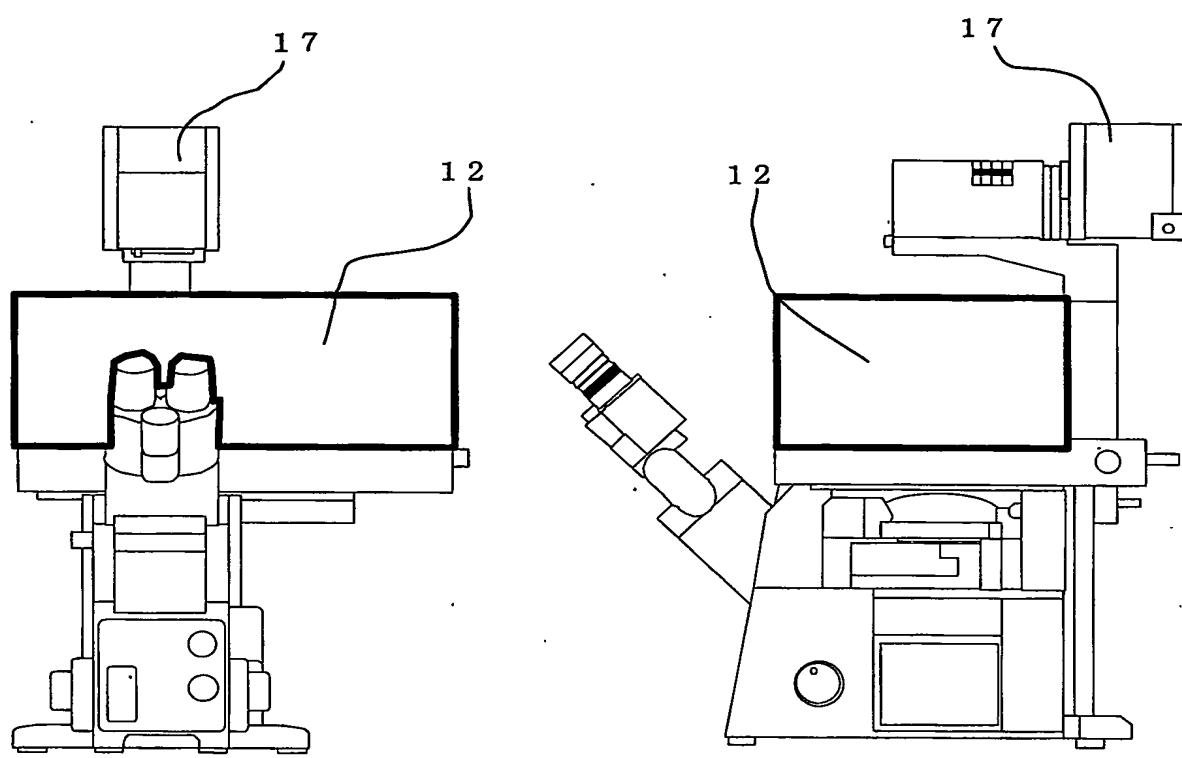


図 3

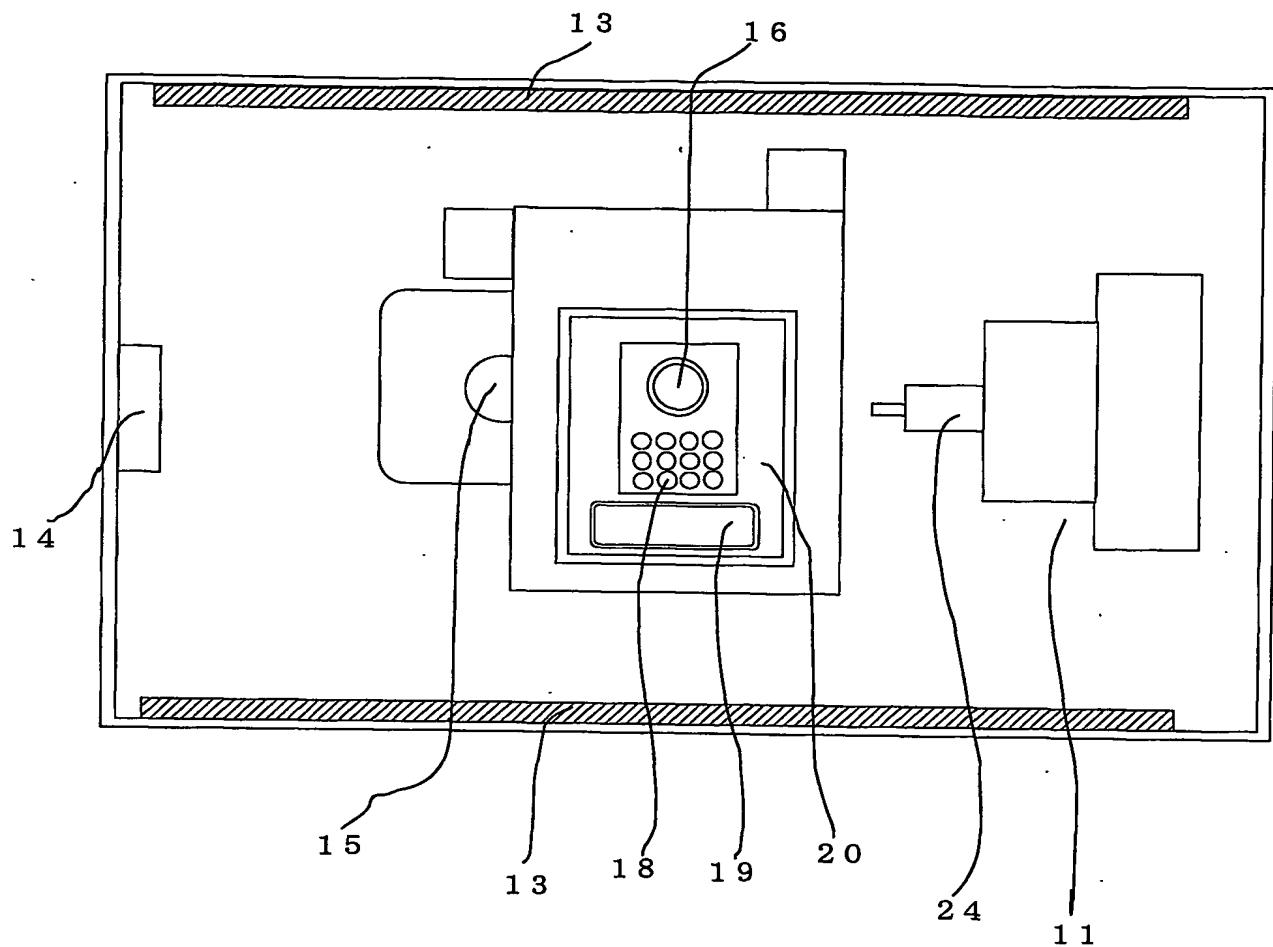


図 4

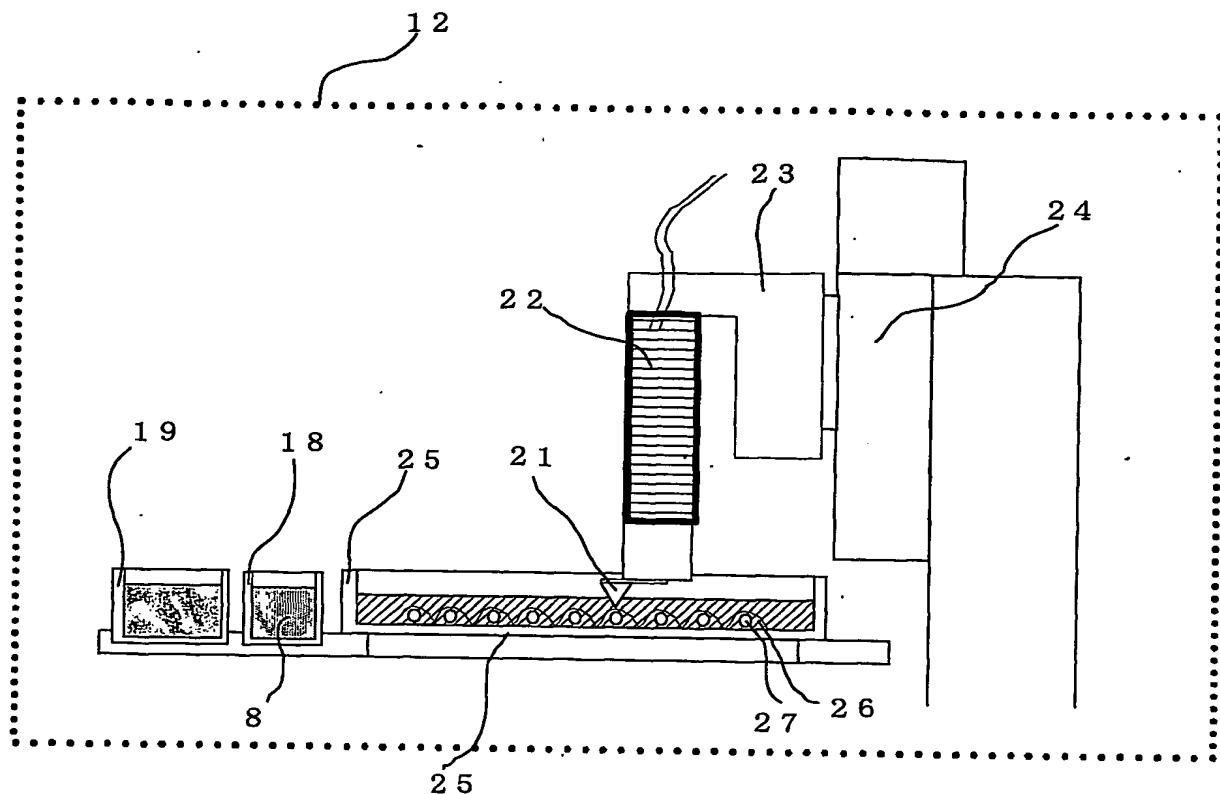


図 5

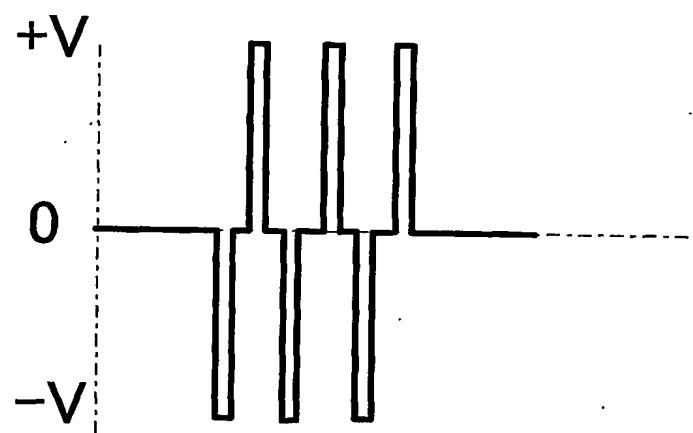


図 6

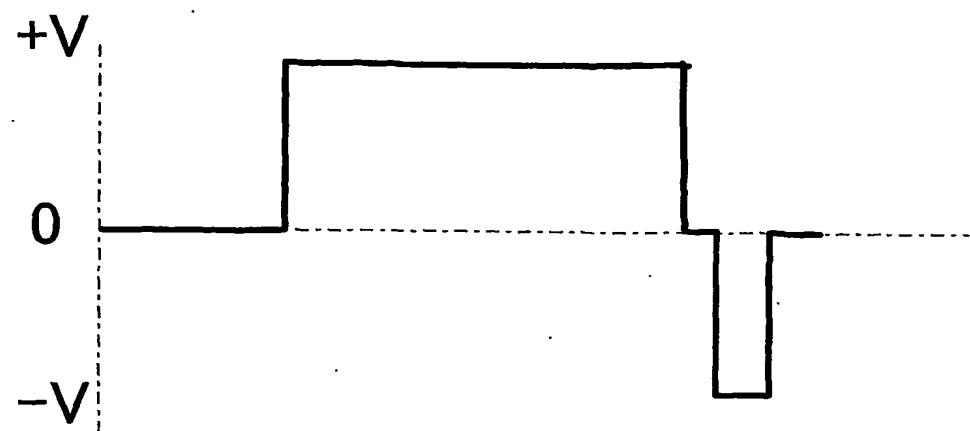


図 7

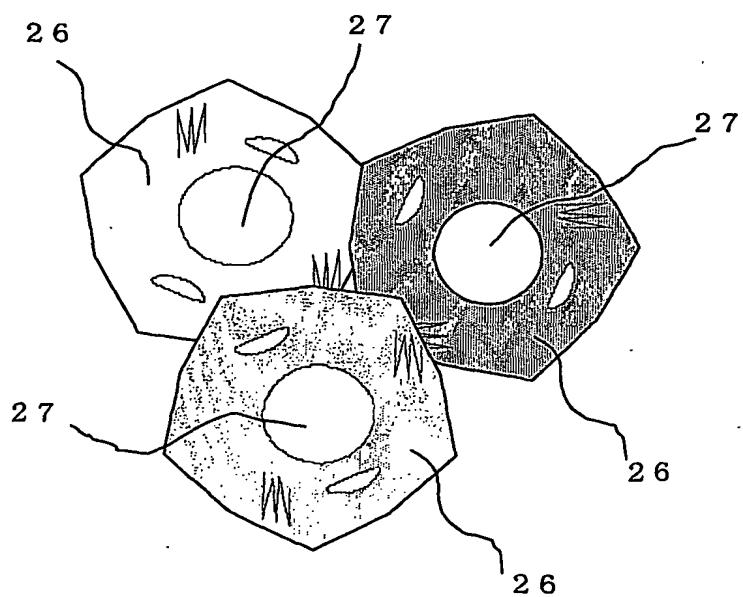


図 8

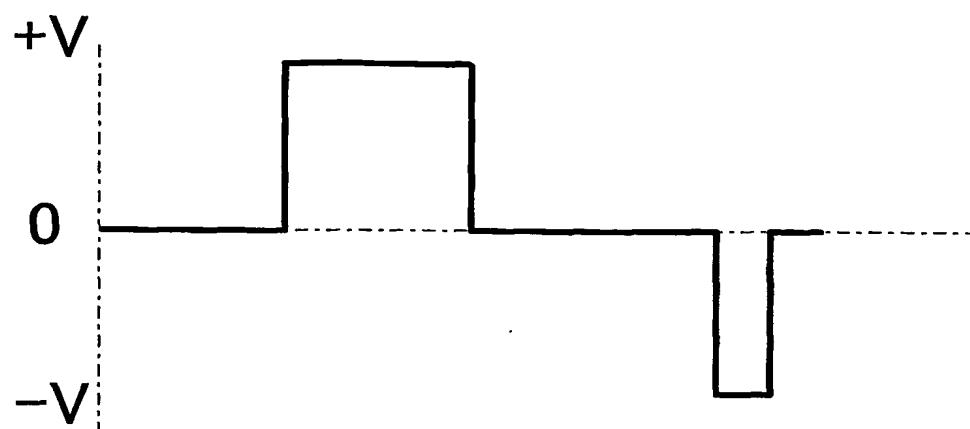


図 9

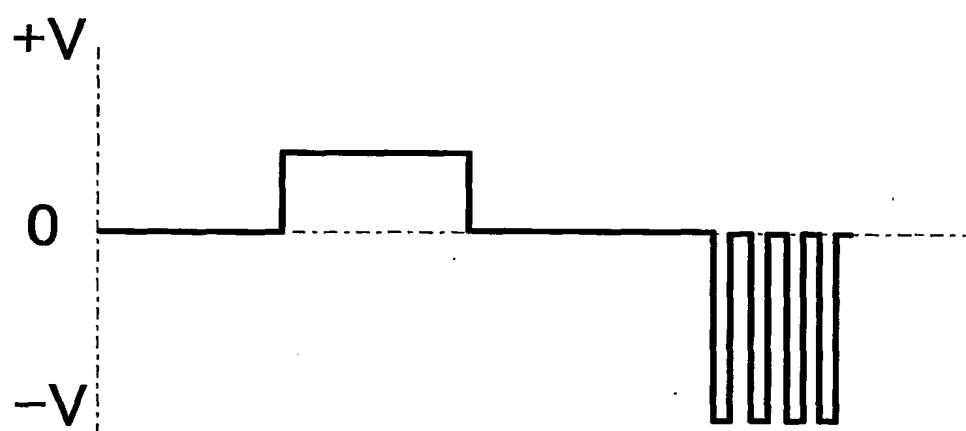


図10

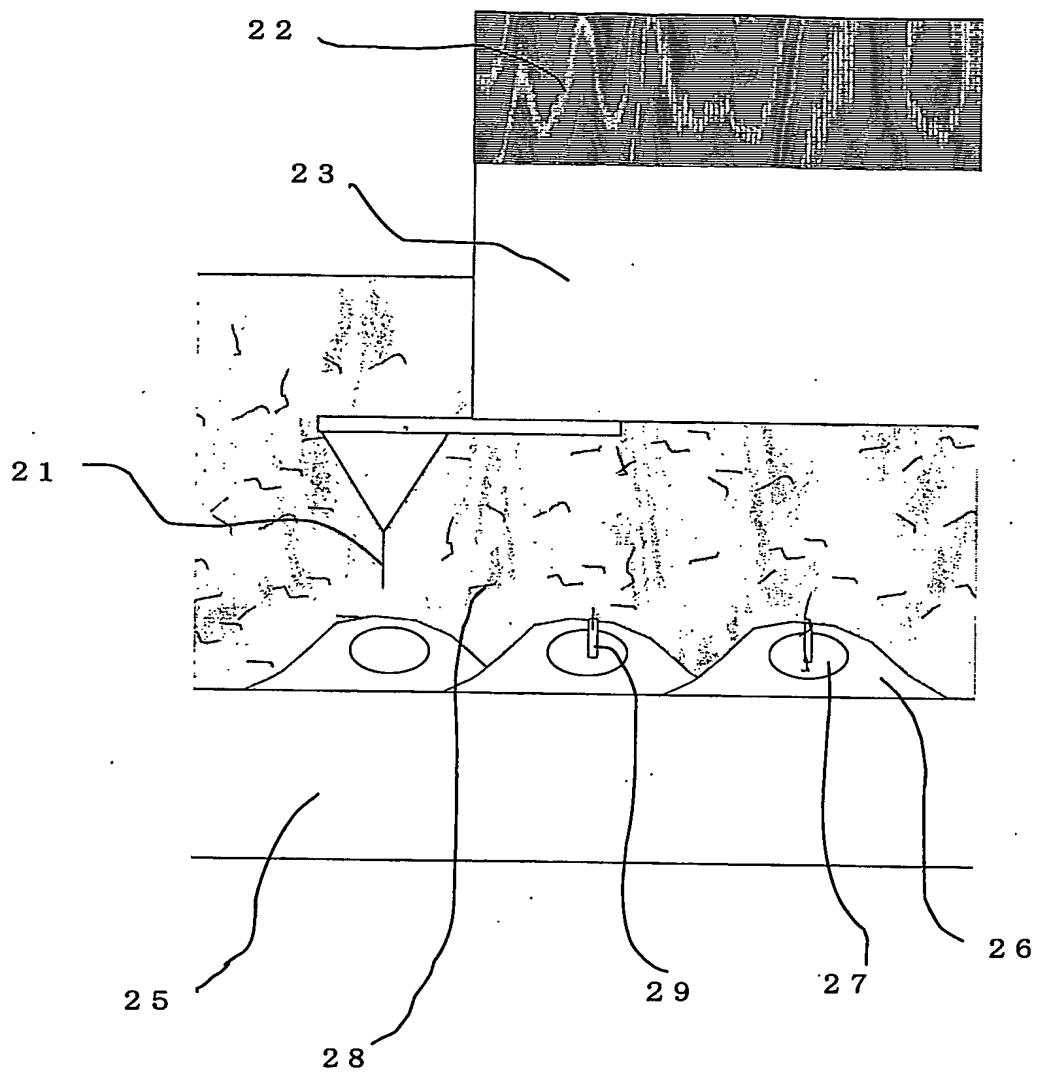


図 1 1

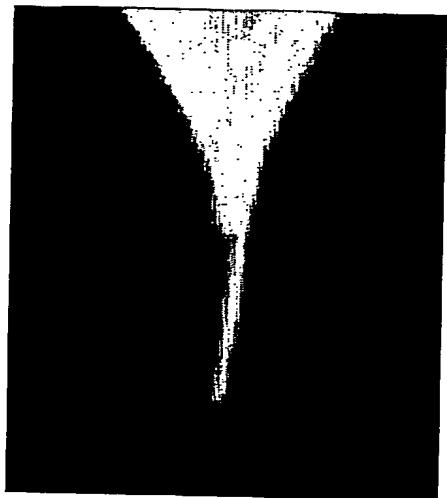
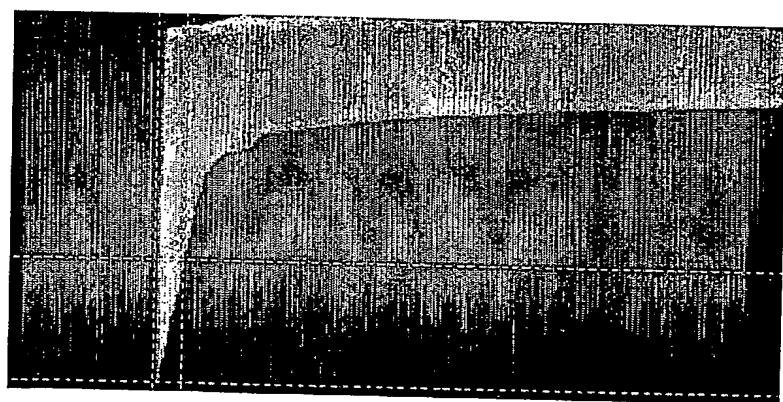


図 1 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12M1/00, C12N5/00, B82B3/00, G01N33/483

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-90, C12M1/00-3/10, C12N1/00-7/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 06-343478 A (Hitachi, Ltd.), 20 December, 1994 (20.12.94), (Family: none)	1, 3, 4, 8-31
Y	US 6063629 A (WOLFGANG LUMMEL), 16 May, 2000 (16.05.00), & EP 0992577 A1	2, 5-7
Y	JP 2003-088383 A (President of Tokyo Institute of Technology), 25 March, 2003 (25.03.03), (Family: none)	5, 7, 8
Y	WO 1999/046361 A1 (Masao KARUBE), 16 September, 1999 (16.09.99), & EP 1063287 A1	6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 May, 2004 (20.05.04)Date of mailing of the international search report
01 June, 2004 (01.06.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005167

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP 2003-325161 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 18 November, 2003 (18.11.03), (Family: none)	1-31
A	JP 03-119989 A (Toshio HIGUCHI), 22 May, 1991 (22.05.91), (Family: none)	1-31
A	JP 05-192171 A (Hitachi, Ltd.), 03 August, 1993 (03.08.93), (Family: none)	1-31
A	JP 01-112976 A (Hitachi, Ltd.), 01 May, 1989 (01.05.89), (Family: none)	1-31

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/005167

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N 15/09, C12M 1/00, C12N 5/00, B82B 3/00, G01N 33/483

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N 15/00-90, C12M 1/00-3/10, C12N 1/00-7/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)
JICSTファイル(JOIS), EUROPAT(QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 06-343478 A (株式会社日立製作所) 1994. 12. 20 (ファミリーなし)	1, 3, 4, 8-31
Y	US 6063629 A (WOLFGANG LUMMEL) 2000. 05. 16 & EP 0992577 A1	2, 5-7
Y	JP 2003-088383 A (東京工業大学長) 2003. 03. 25 (ファミリーなし)	2
Y	WO 1999/046361 A1 (輕部征夫) 1999. 09. 16 & EP1063287 A1	5, 7, 8
Y		6

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 05. 2004

国際調査報告の発送日

01. 6. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

阪野 誠司

4 N 9286

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	JP 2003-325161 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2003.11.18 (ファミリーなし)	1-31
A	JP 03-119989 A (樋口俊郎) 1991.05.22 (ファミリーなし)	1-31
A	JP 05-192171 A (株式会社日立製作所) 1993.08.03 (ファミリーなし)	1-31
A	JP 01-112976 A (株式会社日立製作所) 1989.05.01 (ファミリーなし)	1-31